

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“Efecto del tiempo de equilibrio pre-congelamiento y adición de ácidos grasos polinsaturados (PUFA) en la dilución de semen de ovino sobre la tasa de sobrevivencia espermática pos-descongelación”

**Tesis para optar el Título Profesional de
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Rodrigo Leonardo Gamarra Cavero
Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia


LIMA - PERÚ

2023

Feedback Studio - Google Chrome
 ev.tumitin.com/app/carta/en_us/?s=8&student_user=1&alpha=2040679335&lang=en_us&u=1117570242

feedback studio Rodrigo Gamarra Tesis rodrigo gamarra

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



"Efecto del tiempo de equilibrio pre-congelamiento y adición de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en la dilución de semen de ovino sobre la tasa de sobrevivencia espermática post-descongelación"

Tesis para optar el Título Profesional de
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Rodrigo Leonardo Gamarra Cavelro
 Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA - PERÚ

Match Overview ✕

17%

Currently viewing standard sources

View English Sources (Beta)

Matches

1	hdl.handle.net <small>Internet Source</small>	2%	>
2	library.co <small>Internet Source</small>	1%	>
3	cybertesis.unmsm.edu... <small>Internet Source</small>	1%	>
4	repositorio.unap.edu.pe <small>Internet Source</small>	1%	>
5	Submitted to Universid... <small>Student Paper</small>	1%	>
6	Jorge Banda R., Shirley ...	1%	>

Page: 1 of 38 Word Count: 7518 Text-Only Report High Resolution On 00:56 20/03/2023

A mi familia, amigos
y todos los que me
apoyaron a lo largo
de la carrera

AGRADECIMIENTOS

Infinitas gracias al Dr. Hugo Deza, a mis amigos y seres queridos que me ayudaron a realizar este proyecto. Gracias al personal de la Estación Experimental de Lurín y a los laboratorios de

FAVEZ por la ayuda.

CONTENIDO

ABSTRACT	6
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
MATERIALES Y MÉTODOS	11
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effects of adding polyunsaturated fatty acids (PUFA) as Sacha Inchi oil in semen extender in sperm survivability post-thaw and the effect equilibrium time pre-thaw in ovine sperm survivability. 4 Asblacks rams in reproductive age were used as sperm donors, in a 2 weekly collections regime for 5 weeks. All ejaculates were added in a pool, in order to eliminate individual differences. The sperm was divided in 4 aliquots: P0, P1, P2 and P3; each with 0%, 1%, 2.5% and 5% of Sacha Inchi oil respectively. TRIS-citrate-glucose (250.25 mM, 79.71mM y 9.99 mM), egg yolk 20%, glycerol 6% were used as semen extender. Methanol 0.05% was used as oil solvent. Glycerol was added at refrigeration temperature. Subjective and objective individual motility, viability, HOST and acrosome integrity were evaluated after thawing. The combination effect of 5% PUFA and 22 hours of equilibrium time had a tendency for increasing beneficial effects in some seminal after-thaw parameters.

Key words: Ram sperm, polyunsaturated fatty acids, cryopreservation, ovine reproduction.

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo determinar los efectos de la adición de ácidos grasos poliinsaturados, mediante aceite de Sacha Inchi, en el dilutor seminal, sobre la sobrevivencia espermática post-descongelamiento y el efecto del tiempo de equilibrio pre-congelamiento sobre la sobrevivencia espermática. Se usaron 4 carneros Asblack en edad reproductiva como donadores de semen, bajo un régimen de 2 colectas semanales durante 5 semanas. El semen fue mezclado en un *pool* para eliminar la variación individual, separándose posteriormente en 4 alícuotas: P0, P1, P2 y P3; con 0%, 1%, 2.5% y 5% de aceite de Sacha Inchi respectivamente. Como dilutor base se utilizó TRIS-citrato-glucosa (250.25 mM, 79.71mM y 9.99 mM), yema de huevo al 20% y glicerol al 6%. Se usó metanol al 0.05% para solubilizar el aceite. La adición del glicerol se hizo al alcanzar la temperatura de refrigeración. Se evaluó motilidad individual subjetiva, viabilidad, HOST e integridad acrosomal. La combinación de una proporción del 5% de PUFA con un tiempo de equilibrio de 22 horas tienden a mejorar algunas características seminales post descongelación.

Palabras clave: Semen ovino, ácidos grasos poliinsaturados, criopreservación, reproducción de ovinos

INTRODUCCIÓN

La crianza de ovinos en el Perú es una actividad tradicional desempeñada mayoritariamente por las poblaciones campesinas de las zonas altoandinas (Alencastre y Gómez, 2005); para quienes, en muchos casos, constituye su principal actividad económica (Montesinos et al., 2015). Aun así, una cantidad considerable de ganaderos se han visto en la necesidad de abandonar la crianza, desanimados por diversas causas como la falta de políticas públicas que apoyen la producción, y, más aún debido a las constantes fluctuaciones en el precio de la lana que año a año ha disminuido. Sin dejar de mencionar, la inequidad en los precios que se les paga por los animales en pie, lo que ha ocasionado una constante disminución en la población de ovinos, observada en las series históricas de los censos agropecuarios de nuestro país (Ministerio Nacional de Agricultura y Riego, 2013).

Las estadísticas muestran que el 81.6% de los ovinos en el Perú pertenecen a pequeños ganaderos con un tamaño de rebaño promedio de 20 animales (Ministerio Nacional de Agricultura y Riego, 2013). Para dichos ganaderos sería muy complicado poder acceder a un carnero de características genéticas y fenotípicas sobresalientes debido a su alto costo. Sin embargo, estos animales son muy necesarios para poder realizar la mejora genética y mejorar la productividad.

Ante esta problemática, una alternativa viable es el uso de la inseminación artificial en las borregas con semen refrigerado o congelado; aunque, se debe considerar que el semen refrigerado tiene un tiempo de conservación que no supera las 96 horas (Mata-

Campuzano. et al., 2014) por lo que sería necesario que el ganadero cuente con un carnero. Mientras que, el semen congelado puede preservar los espermatozoides con genes deseables por un tiempo aún indeterminado, lo que facilita su distribución y uso en hembras ubicadas en cualquier latitud (Mortazavi *et al*, 2020). Asimismo, se optimiza el uso de los carneros al permitir servir a un gran número de borregas y contribuye a un mejor control de enfermedades venéreas (Parkinson y Morrell, 2019).

En la actualidad continúa la investigación sobre la congelación de semen de carnero, debido a la falta de éxito reproductivo causado por las dificultades en el mantenimiento de la integridad espermática (Alvarez *et al.*, 2019). Esto se debe a que, a diferencia de otras especies, el semen ovino tiene una sensibilidad particular a los cambios de temperatura, dificultando su manipulación (Salomon y Maxwell, 2000). Esta particularidad proviene de la diferente composición lipídica del espermalema (Poulos *et al.*, 1975; Van Tran *et al.*, 2017). El espermatozoide ovino cuenta con una baja relación colesterol: fosfolípido y menores niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Mocé *et al.*, 2010). Dicha composición de lípidos incrementa la sensibilidad al frío (“Shock frío”), la misma que es el resultado de una transición en los lípidos de la membrana, al pasar de un estado “fluido” a gel (Drobnis *et al.*, 1993). En este proceso se da una reorganización de los fosfolípidos en la membrana plasmática, alterando el control sobre el paso de solutos y propiciando la pérdida de su capacidad selectiva (Amann y Pickett, 1987; Drobnis *et al.*, 1993), generando una disminución de motilidad espermática, daños en el acrosoma y disminución de la viabilidad de estos gametos (White, 1993).

La mayoría de dilutores de semen ovino incluyen en su composición la yema de huevo, que entre otros componentes aporta colesterol, el cual estabiliza la membrana plasmática y mantiene a los fosfolípidos organizados mientras la temperatura disminuye (Amann y Pickett, 1987). Otra alternativa es la adición de PUFA que al ser añadidos en la dieta de los animales o en los dilutores para semen ovino podrían permitir una mejora en las características post descongelamiento (Wathes *et al.*, 2007; Towhidi *et al.*, 2013; Van Tran *et al.*, 2017; Ezazi *et al.*, 2019; Carro *et al.*, 2020), debido a que tendrían un rol similar al colesterol y podrían generar una adecuada estabilidad de la membrana durante la congelación (Lee *et al.*, 2019). Además, es importante tener en consideración el tiempo de equilibrio pre congelación, el cual ha demostrado que puede tener efectos sobre las características de los espermatozoides durante la congelación de semen de carnero; pues, se ha observado que un incremento en su tiempo hasta las 22 horas permite obtener mejores tasas de motilidad espermática e integridad y funcionalidad del acrosoma, pero aún requiere optimizar sus resultados (Paul *et al.*, 2020).

Por tal motivo, se desarrolló el presente trabajo de investigación con el objetivo de analizar el efecto de la adición de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en el dilutor y el incremento del tiempo de equilibrio pre-congelamiento sobre la sobrevivencia espermática post-descongelación en semen de carneros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El presente estudio se realizó en la Estación Experimental UPCH Lurín, ubicada en el distrito de Lurín, Lima, Perú, a una altitud de 4 msnm (12°17'21"LS, 76°51'46" LO). El estudio se realizó durante los meses de marzo y abril del año 2022, período de tiempo en el cual la temperatura máxima fue 29.3°C y la temperatura mínima fue 15.4°C (SENAMHI, 2022).

Tipo de estudio

El presente trabajo de investigación corresponde a un tipo de estudio experimental

Animales

Para la colecta de semen se utilizaron 4 carneros Asblack adultos entre 2 y 5 años de edad, el número de animales se encontró condicionado a la disponibilidad de los mismos en la Estación Experimental de Lurín. Número similar de animales también fue observado en reportes publicados de experimentos similares (Paulenz *et al* 2002; Roostaei-Ali Mehr y Noori, 2013; Paul *et al.*, 2020).

El manejo de los animales correspondió a un sistema intensivo, contando con agua y alimento *ad libitum*. La dieta estuvo principalmente compuesta de ensilado de chala y alimento balanceado. Durante el experimento los carneros se encontraron saludables y su condición corporal se mantuvo en una calificación de 3 en una escala de 5 puntos. El entrenamiento de los carneros para la colecta de semen inició 30 días antes del inicio del experimento, siguiendo las recomendaciones reportadas por Ambrosi *et al.* (2018). Desde el entrenamiento de los carneros y durante el experimento, se realizaron 2 colectas cada

semana; el intervalo entre colectas se encontró dentro de los rangos estudiados para la especie y que no generan alteración en la calidad del eyaculado (Miloud y Karima, 2015).

En el experimento fueron realizadas un total de 10 colectas de cada carnero. En cada día de colecta, los eyaculados de los cuatro carneros fueron mezclados con la finalidad de obtener un *pool* y eliminar el efecto individuo o carnero, cada *pool* fue sometido a todos los tratamientos resultantes de la interacción del factor proporción de PUFA adicionado al dilutor y el factor tiempo de equilibrio (Cuadro 1, gráfica 1).

Cuadro 1: Tratamientos empleados en el experimento resultantes de la combinación de la adición de las diferentes proporciones de PUFA al dilutor y los tiempos de equilibrio evaluados.

Adición de PUFA	P0		P1		P2		P3	
Tiempo de equilibrio	E2	E22	E2	E22	E2	E22	E2	E22
Tratamiento	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Repeticiones	10	10	10	10	10	10	10	10

P. indica la adición de PUFA en el dilutor (P0: 0.0% de PUFA; P1: 1.0% de PUFA; P2: 2.5% de PUFA y P3: 5.0% de PUFA) y E. indica el tiempo de equilibrio al que fueron sometidas las pajillas de semen (E2: 2 horas de equilibrio; E22: 22 horas de equilibrio)

Coleta de semen

La colecta de semen se realizó empleando una vagina artificial Walmur ® (Walmur, Uruguay). Se emplearon fundas de látex y copas de colecta de semen de manera individual para cada carnero. Después de su uso, las fundas y las copas fueron lavadas con agua corriente y se enjuagaron con agua destilada. Posteriormente fueron dejados a secar a temperatura ambiente y se guardó en bolsas herméticas.

Previo a cada colecta se realizó la higiene del prepucio del carnero a través de la aspersion de solución fisiológica (Cloruro de sodio al 0.9%) y secado con papel toalla. Conforme los carneros fueron preparados para la colecta fueron atados con un cabestrillo a una barra de sujeción, una vez preparados los cuatro animales, se procedió con la colecta, que se realizó empleado la vagina artificial temperada a 38.5-39.5°C. Una vez colectado el semen, se retiró la copa de la vagina y se colocó inmediatamente en baño maría temperado a 37°C aislado térmicamente hasta terminar la colecta de los cuatro animales, luego todas las muestras fueron transportadas al laboratorio para su procesamiento.

Dilución del eyaculado

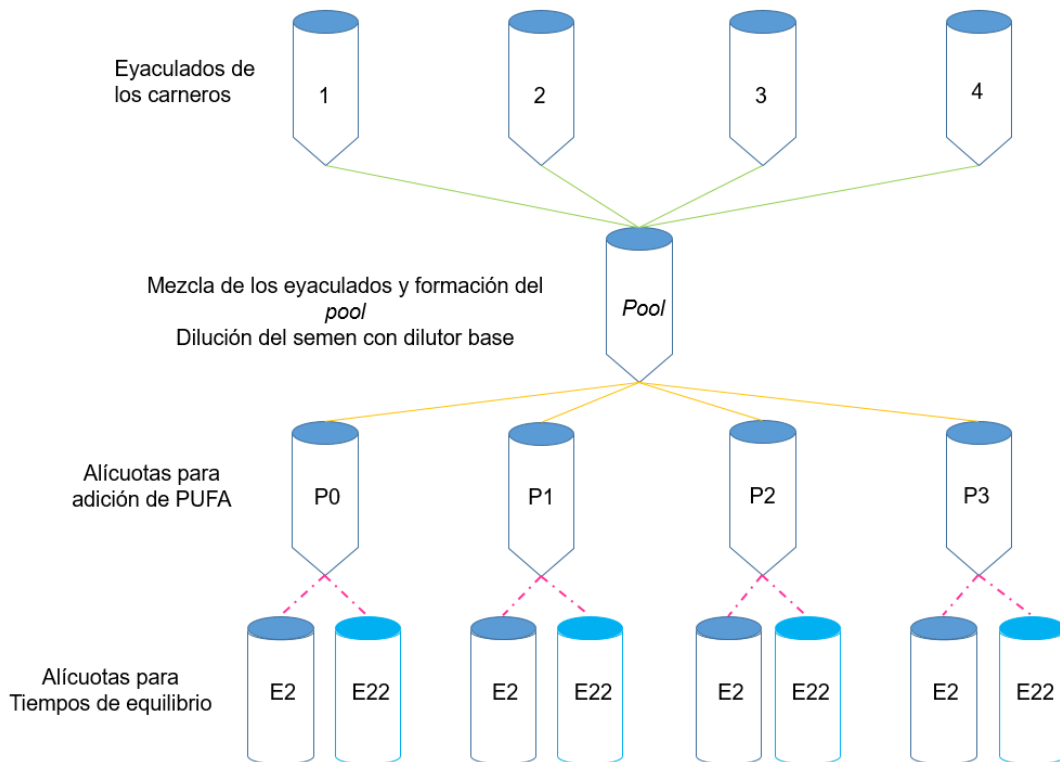
Durante el experimento ninguno de los eyaculados tuvo una calificación menor a 4 en la evaluación de motilidad masal (motivo de descarte del eyaculado (Nasiri *et al.*, 2012; Kaka *et al.*, 2015; Bucak *et al.*, 2020)); por lo que, todas las muestras fueron procesadas. Una vez valorada la motilidad masal se procedió a realizar el *pool* (Figura 1). Posteriormente se determinó la concentración espermática mediante hemocitómetro (Perumal *et al.*, 2017) para pre-diluirlo a 1600×10^6 espermatozoides por mililitro. Para la pre-dilución se utilizó una mezcla de 80% TRIS-citrato-glucosa (Tris-hidroximetil

aminometano 250.25 mM, ácido cítrico monohidratado 79.71 mM, glucosa 9.99 mM) y 20% de yema de huevo (da Silva Maia *et al.*, 2009). Posterior a la pre-dilución, el semen fue separado en 4 alícuotas (P0, P1, P2 y P3) con la finalidad de realizar la dilución con las diferentes proporciones de PUFA. Las alícuotas y los aditivos fueron mantenidos en un baño maría a 37°C.

P0 constituyó el tratamiento control y por ende no se le añadió PUFA, P1, P2 y P3 fueron las alícuotas a las que se les añadió respectivamente, 1.0%, 2.5% y 5.0% (v/v) de aceite de Sacha Inchi (Inca Inchi ®, Agroindustrias Amazónicas, San Martín, Perú), además de 0.05% de metanol con la finalidad de favorecer la adecuada homogenización del aceite en el medio líquido, la proporción de metanol añadido fue la misma para las 3 alícuotas.

La dilución del semen se realizó en 2 pasos, que implica la adición del glicerol en el segundo paso al momento del inicio del equilibramiento, cuando el semen llegó a una temperatura de 5°C (Paul *et al.*, 2020). Para mantener la temperatura lo más estable posible, se colocó el semen en un baño maría en un vaso de precipitado Pyrex dentro de una caja termoaislante de polietileno expandido. La fracción 2 consistió del 20% del volumen total del extensor, siendo la mezcla de TRIS-citrato-glucosa con yema de huevo más el 6% del glicerol.

Fig 1. Formación de *pool* de semen y alícuotas para cada uno de los tratamientos.



Fuente: Elaboración propia, 2022

Refrigeración del semen

Las alícuotas fueron colocadas en baño maría a 37°C y enfriadas hasta 5°C en 2.5 horas aproximadamente. Momento en el que se añadió la segunda fracción del dilutor compuesta de TRIS-citrato-glucosa con yema de huevo y glicerol al 6% (v/v) (Paul *et al.*, 2020). Luego de completada la dilución, cada alícuota fue dividida en dos, una de ellas fue equilibrada por 2 horas (E2) (Towhidi *et al.*, 2013; Kaka *et al.*, 2015) y la otra por 22 horas (E22) (Paul *et al.*, 2020). Culminado el tiempo de equilibrio establecido, el semen fue envasado en pajillas de 0.25 mililitros, tanto las pajillas como los materiales empleados en el envasado del semen se mantuvieron todo el tiempo a 5°C. Se determinó previamente en un refrigerador convencional la posición y la potencia del refrigerador

para mantener el vaso de precipitado con las pajillas sumergidas en agua para mantener la temperatura lo más homogénea posible.

Congelación del semen

Para la congelación, se empleó una caja de poliestireno expandido a la que se añadió nitrógeno líquido hasta una altura de 7cm, mientras se estabilizó el movimiento del nitrógeno se ordenaron las pajillas equidistantes lateralmente sobre una rejilla de congelación a la que también se encontró adherida el sensor del termómetro termocupla (VA8060, Dual Ways Termocuple Meter, Shanghai Yi Hua V & A Instrument Co., Ltd.), con el que se controló el descenso de la temperatura. Una vez ordenadas las pajillas sobre la rejilla fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido, enfriándose de 5°C hasta -120°C a un ritmo de -25°C/minuto (Ferreira *et al.*, 2019). Una vez que se llegó a una temperatura de -120°C, las pajillas fueron sumergidas en el nitrógeno líquido; inmediatamente después fueron almacenadas en *goblets* y cañas dentro de un tanque criogénico (Ferreira *et al.*, 2019).

Análisis espermático

Para el análisis espermático, la pajilla de semen fue descongelada a 37°C por 30 segundos (Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016; Galarza *et al.*, 2019), a continuación, el contenido de la pajilla fue vaciado en un tubo Eppendorf de 1 mL el cual se mantuvo en baño maría a 37°C (Hinotek, CU-420). Todas las alícuotas necesarias para las diferentes evaluaciones fueron tomadas del contenido de una misma pajilla.

Evaluación subjetiva de la motilidad individual

La motilidad individual se evaluó con 25 µL de semen en un microscopio de fondo claro a 400X, usando una platina térmica a 37°C (Cabrera *et al.*, 2011). Para la estimación porcentual, se contaron aproximadamente 100 células y se clasificó en motiles y no motiles según la fórmula 1. El promedio de 8 evaluaciones fue tomado como la motilidad final. Para evitar sesgos, el análisis de motilidad fue realizado por 3 evaluadores diferentes sin saber el tratamiento que correspondía la muestra.

Fórmula 1: Determinación de motilidad individual:

$$\text{Motilidad individual (\%)} = \frac{\text{Espermatozoides m\acute{o}viles (n)}}{\text{Total de espermatozoides observados (n)}} \times 100$$

Análisis espermático asistido por computadora (CASA)

Sólo en el semen congelado – descongelado se evaluó la motilidad y velocidad espermática objetivamente mediante el sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) – Maranganí, ubicado en el distrito de Maranganí, Provincia de Canas, Departamento del Cusco. Para ello se descongelaron las pajillas de la manera previamente descrita, se utilizaron 25 µL del semen descongelado diluidos en 75 µL de dilutor. Se tomaron 10 µL de la mezcla y se colocó en un portaobjetos temperado en una platina térmica. Se tomaron 3 campos por muestra para analizarse por el sistema CASA. Se analizaron los datos de motilidad, motilidad progresiva, velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL) y velocidad promedio (VAP).

Vitalidad espermática

Para la determinación de la viabilidad espermática se utilizó la tinción Eosina Y 1% - Nigrosina 10% (Agarwal *et al.*, 2017). Se tomó una muestra de 10 µL del semen descongelado y se colocó sobre una lámina portaobjetos previamente temperada a 37°C. A la muestra de semen se le añadieron 20 µl de eosina Y y 20 µL de nigrosina, se homogenizó el semen con los colorantes y de allí se tomó 10 µL que se colocaron sobre una lámina portaobjetos previamente temperada a 37°C para realizar un frotis. Luego de realizado el frotis, se esperó a que secara la lámina para ser observada a 1000X en un microscopio óptico. Se contaron 200 células en total, determinándose como espermatozoides vivos a los que no se colorearon y muertos a los espermatozoides teñidos de color rosado-rojizo. La determinación del porcentaje de vitalidad se realizó de acuerdo a la fórmula 2.

Fórmula 2: Determinación de vitalidad espermática

$$\text{Vitalidad espermática (\%)} = \frac{\text{Espermatozoides vivos (n)}}{\text{Total de espermatozoides observados (n)}} \times 100$$

Integridad funcional de membrana y reacción acrosomal

La integridad funcional de la membrana y el acrosoma fueron evaluados simultáneamente mediante la combinación de la prueba HOST (Hypo-osmotic Swelling Test) y la tinción Azul de Coomassie. La solución hipoosmótica se preparó según lo establecido por Jeyendran *et al.* (1992). La combinación de ambas técnicas se realizó utilizando el procedimiento descrito por Carretero *et al.* (2019). Para el protocolo se incubaron 25 µL de muestra en 100 µL de la solución hipoosmótica a 37°C por 20 minutos. Posterior a ello, se agregó 125 µL de paraformaldehído 4% y se incubó por 4 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó la muestra a 3000 rpm por 10 minutos, pasado el tiempo se quitó el sobrenadante y se realizó un lavado con 125 µL de PBS. Una vez

culminado el procedimiento, se colocó 10 μ L en una lámina portaobjetos que fueron esparcidos con movimientos circulares, luego se dejó secar a temperatura ambiente. Cuando la lámina estuvo seca, se aplicó una gota del colorante Azul de Coomassie y se dejó actuar por 5 minutos. A continuación, se realizó un lavado con agua destilada para quitar el exceso de colorante, se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se observó en el microscopio con aceite de inmersión (1000X). Se contaron 200 células y se identificaron 4 patrones de clasificación:

Espermatozoides con membrana funcional (HOS+) y presencia de acrosoma (CB+)

Espermatozoides con membrana funcional (HOS+) y ausencia de acrosoma (CB-)

Espermatozoides con membrana no funcional (HOS-) y presencia de acrosoma (CB+)

Espermatozoides con membrana no funcional (HOS-) y ausencia de acrosoma (CB-)

Considerándose HOS+ a aquel espermatozoide que presentó la cola enrollada y un CB+ a aquel espermatozoide que muestra una tinción intensa en el polo proximal de la cabeza del espermatozoide, lo cual indica la presencia de acrosoma.

Procesamiento y análisis de datos

Para el análisis de datos, primeramente, se evaluó la normalidad de los mismos empleando el test de Shapiro – Wilk; aquellas variables cuyos resultados no siguieron una distribución normal fueron ajustados; para elegir el mejor método de ajuste se empleó el comando “*ladder*” del paquete estadístico Stata17®. De todas las variables del estudio fue necesario realizar la transformación cuadrática a los resultados de los test de hipoosmosis y motilidad progresiva evaluada con CASA; mientras que, una

transformación logarítmica fue necesaria para evaluar los datos de las diferentes velocidades de los espermatozoides evaluadas con CASA.

Una vez ajustada la normalidad, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) empleando un diseño completo al azar con arreglo factorial 4 x 2 (4 niveles para el factor PUFA x 2 niveles del factor tiempo de equilibrio) empleando el siguiente modelo aditivo lineal.

$$y_{ijk} = \mu.. + \rho_i + \tau_j + (\rho\tau)_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

y_{ijk} = Es la variable respuesta

$\mu..$ = Es el efecto de la media poblacional

ρ_i = Es el efecto del i-ésimo nivel del factor adición de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) al dilutor

τ_j = Es el efecto del j-ésimo nivel del factor tiempo de equilibrio

$(\rho\tau)_{ij}$ = Es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel del factor PUFA con el j-ésimo nivel del factor tiempo de equilibrio

e_{ijk} = Es el error experimental (Calzada, 1970)

Se usó el experimento factorial, debido a que permite evaluar individualmente cada factor (factor adición de PUFA y factor tiempo de equilibrio) y la combinación de ambos que da por resultado los denominados tratamientos (Daniel, 1991).

Se determinó diferencia significativa cuando $P < 0.05$. La prueba de medias se realizó empleando el test de Tukey. Mientras que una tendencia se determinó cuando el valor de P se encontró entre 0.05 y 0.30

Los resultados fueron resumidos en tablas y muestran los promedios \pm error estándar y la diferencia significativa fue señalada por letras en superíndices. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software Stata (Versión 17.0 para Windows, StataCorp, Texas).

RESULTADOS

Los resultados que se muestran a continuación en la tabla 1, hacen referencia a la interacción de las diferentes concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) adicionados al dilutor de semen con los tiempos de equilibrio pre – congelamiento del semen de carneros. No se observó diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las diferentes interacciones para ninguna de las variables analizadas.

Una de las variables en la que se observó una tendencia fue la integridad de membrana, valorada a través del test de hipoosmosis (HOST, pos sus siglas en inglés hypo osmotic swelling test), para ésta variable un mayor porcentaje de espermatozoides con membrana intacta se apreció al adicionar el 5% de PUFA al dilutor y equilibrar el semen por espacio de 22 horas; este porcentaje de espermatozoides con membrana intacta tendió a disminuir cuando el semen fue diluido con el 5% de PUFA y sólo tuvo un tiempo de equilibrio de 2 horas, valores menores fueron observados cuando el semen fue diluido con el 2.5% de PUFA y equilibrado por 2 o 22 horas y los menores porcentajes de espermatozoides con membrana intacta se apreciaron en las combinaciones de la adición del 1% de PUFA o no añadir PUFA al dilutor con cualquiera de los tiempos de equilibrio.

Tabla 3. Efecto de la interacción de la concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) empleados en el dilutor en base a Tris y el tiempo de equilibrio sobre las características (promedio \pm error estándar) del semen diluido y congelado de carneros Asblack.

Característica	n	Interacción de los niveles de PUFA empleados en el dilutor y los tiempos de equilibrio								p-value
		0% (P0)		1.0% (P1)		2.5% (P2)		5.0% (P3)		
Tiempos de equilibrio		2h (E2)	22h (E22)	2h (E2)	22h (E22)	2h (E2)	22h (E22)	2h (E2)	22h (E22)	
Motilidad individual a la refrigeración (5°C), %	10	40.3 \pm 1.4	49.0 \pm 1.1	44.7 \pm 1.5	52.0 \pm 1.1	46.7 \pm 1.4	52.5 \pm 1.6	51.0 \pm 1.6	57.2 \pm 1.3	0.5657
Motilidad individual a la descongelación, %	10	16.8 \pm 1.6	22.0 \pm 2.1	21.7 \pm 1.7	20.2 \pm 2.2	25.7 \pm 1.8	23.5 \pm 2.1	26.9 \pm 2.2	23.3 \pm 2.1	0.7205
Motilidad CASA, %	10	15.4 \pm 1.4	20.8 \pm 2.5	18.4 \pm 1.5	20.8 \pm 2.4	21.4 \pm 2.3	21.1 \pm 2.9	18.5 \pm 2.4	22.7 \pm 3.5	0.6055
Motilidad progresiva CASA, %	10	11.7 \pm 1.4	17.3 \pm 2.4	15.0 \pm 1.3	18.1 \pm 2.3	18.5 \pm 2.2	19.2 \pm 2.7	15.8 \pm 2.4	19.6 \pm 3.6	0.6532

VCL \ddagger , $\mu\text{m/s}$	10	37.0 \pm 3.2	49.9 \pm 4.9	41.5 \pm 2.9	49.2 \pm 4.7	43.8 \pm 3.0	54.7 \pm 5.0	46.4 \pm 5.4	52.3 \pm 8.6	0.6891
VSL \ddagger , $\mu\text{m/s}$	10	21.8 \pm 1.8	25.0 \pm 2.3	21.1 \pm 1.2	23.4 \pm 1.7	26.0 \pm 2.1	30.3 \pm 3.2	24.5 \pm 3.0	26.0 \pm 3.0	0.9607
VAP \ddagger , $\mu\text{m/s}$	10	24.9 \pm 2.0	30.2 \pm 2.4	25.2 \pm 1.3	28.8 \pm 2.0	30.1 \pm 2.0	35.3 \pm 3.3	28.8 \pm 3.2	31.2 \pm 3.7	0.8852
Vitalidad, %	10	45.9 \pm 3.3	56.7 \pm 2.4	54.5 \pm 2.7	66.0 \pm 2.3	56.1 \pm 2.0	70.7 \pm 2.5	61.6 \pm 2.2	77.0 \pm 2.6	0.7572
Test hipo osmótico (HOST ‡), %	10	41.0 \pm 2.4 ^c	37.5 \pm 2.0 ^c	38.0 \pm 4.3 ^c	44.5 \pm 2.5 ^c	50.2 \pm 2.7 ^b	51.9 \pm 2.0 ^b	52.9 \pm 1.7 ^b	57.8 \pm 1.8 ^a	0.2226
Integridad de acrosoma, %	10	20.0 \pm 3.5	28.7 \pm 3.6	26.3 \pm 3.4	32.5 \pm 3.3	33.4 \pm 3.0	36.5 \pm 2.7	42.6 \pm 3.3	45.5 \pm 1.8	0.7514

Adicionalmente el diseño estadístico empleado permitió realizar el análisis de efectos principales (adición de ácidos grasos poliinsaturados [PUFA] y tiempos de equilibrio), encontrándose que la inclusión de una mayor concentración de PUFA (5.0%) en el dilutor tendría efectos beneficiosos sobre variables como la motilidad individual, vitalidad, integridad de membrana e integridad de acrosoma de espermatozoides de carneros y que ampliar del tiempo de equilibrio de 2 a 22 horas podría tener efectos benéficos sobre la motilidad individual, velocidad, vialidad e integridad de acrosoma de los espermatozoides.

En este diseño estadístico se observó una tendencia a la mejoría al incrementar el porcentaje PUFA y al utilizar 22 horas de tiempo de equilibrio. Con PUFA se observó tendencias a mejora en motilidad individual, vitalidad, integridad de membrana e integridad acrosomal. Con el tiempo de equilibrio 22 horas se observaron tendencias de beneficios a motilidad individual, velocidad, vitalidad e integridad acrosomal.

DISCUSIÓN

El proceso de congelación genera un daño considerable al espermatozoide, debido principalmente al cambio en la composición de lípidos en la membrana de los espermatozoides. Ante ello el uso de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) constituye una alternativa interesante por contribuir en la fluidez de la membrana y el mantenimiento de la integridad lipídica de esta (Van Tran *et al.*, 2017). El mecanismo de los PUFA para preservar la viabilidad y motilidad espermática es atribuido a su capacidad de sustituir ácidos grasos en la membrana espermática y mitocondrial de los espermatozoides (Kaka *et al.*, 2015). Pero, se debe considerar que estos ácidos grasos son susceptibles a la peroxidación lipídica (Lenzi *et al.*, 2000; Guthrie y Welch, 2012), principalmente generada por un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), que inician una serie de eventos bioquímicos conducentes a la peroxidación, comprometiendo la integridad funcional del espermatozoide (Kandelousi *et al.*, 2013). Por ende, controlar la generación de radicales y la subsecuente peroxidación lipídica de la membrana celular son de importancia (Sicherle *et al.*, 2011; Guthrie y Welch, 2012) en el mantenimiento de la calidad de los espermatozoides.

Diversos estudios han sido conducidos para evaluar el efecto de los PUFA sobre la reproducción. El uso de los PUFA en la dieta puede permitir una mejora no solo en la calidad seminal (Ezazi *et al.*, 2019), sino también en la esteroidogénesis (Wathes *et al.*, 2007). Empero, la adición en el dilutor junto con antioxidantes tendría efectos mucho más benéficos, pues podría generar un adecuado recubrimiento del espermatozoide sin incrementar la producción de ROS, hecho que se vería reflejado en la calidad espermática (Nasiri *et al.*, 2012, Towhidi *et al.*, 2013; Kaka *et al.*, 2015). De manera similar, en este

estudio se presenció una tendencia en la mejoría de integridad de membrana al test de Hipoosmosis, siendo aparentemente más beneficio la adición de PUFA a 5% y con mayores tiempos de equilibrio.

Una tendencia a mejoría en las características seminales, no sólo podría ser atribuida al mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados tipo ω -6 y ω -3 (ácido linoléico principalmente), que componen más del 80% del aceite de Sacha Inchi (Castaño *et al.*, 2012) empleado en el presente estudio, sino también al contenido de antioxidantes presentes en el aceite de Sacha Inchi, la capacidad antioxidante presente en dicho aceite es dada por su alto contenido de tocoferoles (Maurer *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2020), permitiendo proteger a los espermatozoides de las ROS.

Además, es de importancia considerar que la adición de los ácidos grasos n-3 al dilutor generan un incremento en el contenido de DHA en la composición lipídica de la membrana del espermatozoide, lo que podría estar relacionado con una mejora de la motilidad individual (Towhidi *et al.*, 2013), tal como se observó en el presente estudio, en el que la motilidad espermática mejoró a medida que se incrementó la concentración de PUFA adicionado en el dilutor. De esta forma, una mayor proporción de PUFA en el dilutor permitiría la incorporación de una mayor cantidad de PUFA en la membrana del espermatozoide lo que generaría una mejor fluidez en la membrana (Safarinejad *et al.* 2010; Towhidi *et al.*, 2013; Kaka *et al.*, 2015) mejorando la motilidad significativamente. Además, los PUFA incrementan la tolerancia a la congelabilidad, al evitar la rigidez de la membrana durante el congelamiento (Lenzi *et al.*, 2000; Towhidi *et al.*, 2013). Por otro lado, los PUFA podrían tener efecto sobre la capacidad permeante de la membrana y la

temperatura a la cual se produce el cambio de fase (Safarinejad *et al.*, 2010), haciendo menos nocivo el congelamiento para los espermatozoides.

La susceptibilidad a la peroxidación lipídica al añadir PUFA como aditivo en el dilutor seminal, es consecuencia de un mayor contenido de ácidos grasos insaturados, lo cual genera un daño a los espermatozoides expuestos (Kaka *et al.*, 2015). Este podría haber sido atenuado en el presente estudio debido a la presencia de fitocompuestos con capacidad antioxidante en el aceite de Sacha Inchi (Castaño *et al.*, 2012), los cuales disminuirían el efecto dañino de las ROS al capturar los radicales libres y como tal colaborar con el mantenimiento del estado redox celular al impedir la reducción de oxígeno molecular a nivel celular (Flora, 2009).

Un incremento en el tiempo de equilibrio podría haber facilitado el recubrimiento de la membrana del espermatozoide con las lipoproteínas de la yema de huevo que generan una mayor estabilidad de la membrana (Paul *et al.*, 2020; Salamon y Maxwell, 1995). Adicionalmente en el presente estudio, el incremento en el tiempo de equilibrio habría permitido que los PUFA tengan una mejor interacción con la membrana de los espermatozoides mejorando la fluidez de la misma e incrementado su tolerancia a la congelabilidad (Safarinejad *et al.* 2010; Towhidi *et al.*, 2013; Kaka *et al.*, 2015)

El tiempo de equilibrio es uno de los aspectos de mayor importancia en la crioconservación de semen, debido a que durante este periodo de tiempo se produce la acción de los crioprotectores, los cuales perfunden al interior de la célula y generan un

balance entre las concentraciones intracelulares y extracelulares (Salamon y Maxwell, 1995). Además, tienen un rol importante en la crioconservación, no sólo porque permiten disminuir el punto de congelación del agua tanto a nivel intracelular como extracelular, sino también porque forman una lámina de protección alrededor de la membrana del espermatozoide (Ruiz - Pesini *et al.*, 2001).

Así pues, el tiempo de equilibrio del semen permite a los espermatozoides adaptarse a las bajas temperaturas; a través de mecanismos que facilitan el paso del crioprotector a través de la membrana. Este paso genera la salida de agua del citoplasma, disminuyendo los daños que se generarían a la membrana del espermatozoide por la formación de cristales de hielo durante la congelación. Asimismo, el tiempo de equilibrio es muy necesario para que el espermatozoide se adapte a las bajas temperaturas (Muiño *et al.*, 2007), hecho que sería crucial en el ovino, pues se ha observado que la exposición de los espermatozoides a temperaturas subfisiológicas antes de la congelación puede inducir alteraciones en la organización de la bicapa lipídica de la membrana del espermatozoide, particularmente en especies con una alta concentración de PUFA (Holt, 2000; Câmara *et al.*, 2011).

Otro parámetro evaluado fue la motilidad individual de los espermatozoides, que es una de las características más valoradas, debido a que se encuentra asociada con el potencial de fertilización de los espermatozoides, así como también es considerada como un indicativo de vitalidad espermática e integridad estructural (Nagy *et al.*, 2015). En este estudio no se determinó una mejoría de motilidad tanto en semen refrigerado como en semen descongelado al adicionar los ácidos grasos poliinsaturados o al incrementar el tiempo de equilibrio.

La tendencia observada al evaluar la interacción entre las concentraciones de PUFA empleadas en el dilutor y los tiempos de equilibrio, indicarían que cuando se usa un 5% de PUFA en el dilutor tal vez sólo sería necesario realizar el tiempo de equilibrio por 2 horas y que cuando no se añade PUFA al dilutor se debería ampliar el tiempo de equilibrio hasta las 22 horas, aspectos que merecen ser estudiados más minuciosamente y que particularmente incluyan la valoración de la peroxidación lipídica, que tal vez podría estar teniendo algún efecto debido a que una mayor concentración de PUFA en el dilutor podría generar una mayor presencia de radicales libres en el mismo cuando se amplía el tiempo de equilibrio, aspecto no determinado en el presente estudio.

Es importante también indicar que el trabajo de investigación presenta limitaciones en el tamaño poblacional de donadores de semen. Asimismo, no se logró realizar el análisis computarizado del semen fresco ni refrigerado, limitando la objetividad de estos parámetros.

Siguiendo esta línea de investigación, sería pertinente evaluar los efectos de la adición del aceite de Sacha Inchi en el dilutor del semen y evaluar la tasa de peroxidación lipídica; así como, la combinación con diferentes antioxidantes y su efecto sobre la atenuación de la misma y finalmente concluir con pruebas en campo, evaluando no sólo el efecto de la adición de aceite de Sacha Inchi en el dilutor sobre la protección en la congelación de semen sino también en los tiempos de refrigeración y su relación con las tasas de preñez y natalidad.

CONCLUSIONES

La combinación de la adición de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) al dilutor de semen con los tiempos de equilibrio pre - congelamiento de semen de carneros, no tuvieron efectos significativos sobre las variables estudiadas, pero si se observó una tendencia a mejorar la integridad de membrana de los espermatozoides.

La evaluación de los efectos principales sugieren que la adición del aceite de Sacha Inchi en una proporción del 2.5 y 5% al dilutor de semen mejoraría motilidad, vitalidad, integridad acrosomal e integridad de membrana en a los espermatozoides de semen ovino y que un tiempo de equilibrio de 22 horas generaría una mejoría de las características de motilidad, velocidad, integridad de membrana e integridad acrosomal del semen post-descongelamiento en comparación con 2 horas de tiempo de equilibrio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal A, Gupta S, Sharma R. 2016. Eosin-Nigrosin staining procedure. En: Agarwal A *et al.* Andrological evaluation of male infertility. Switzerland: Springer. 73-77 p.
2. Alencastre R, Gómez N. 2005. Comportamiento reproductivo del ovino criollo en el altiplano peruano. Arch Zootec: 54: 541-544 p.
3. Alencastre RG. 1997. Producción de ovinos. Universidad Nacional del Altiplano: Puno. 319 p.
4. Alvarez M, Anel-López L, Boixo JC, Chamorro C, Neila-Montero M, Montes-Garrido R *et al.* 2019. Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. Reprod Dom Anim: 54: 32-40 p.
5. Amann RP, Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J Equine Vet Sci 7: 145-173 p.
6. Ambrosi CP, Rubio N, Giménez G, Venturino A, Aisen EG, López-Armengol MF. 2018. Modeling of behavioral responses for successful selection of easy-to-train rams for semen collection with an artificial vagina. Anim Reprod Sci: 193: 90-97 p.
7. Arando A, Delgado JV, Fernández-Prior A, León JM, Bermúdez-Oria A, Nogales S, Pérez-Marín CC. 2019. Effect of different olive oil-derived antioxidants (hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol) on the quality of frozen-thawed ram sperm. Cryobiology: 86: 33-39 p.
8. Bucak M, Keskin N, Ili P, Bodu M, Akalin PP, Öztürk AE *et al.* 2020. Decreasing glycerol content by co-supplementation of trehalose and taxifolin hydrate in ram semen extender: Microscopic, oxidative stress, and gene expression analyses. Cryobiology: 96: 19-29 p.

9. Cabrera P, Ayulo A, Pantoja C. 2011. Efecto del dilutor Tris y citrato con yema de huevo de codorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. *Rev Inv Vet Peru* 22: 105-113 p.
10. Calzada J. 1970. *Métodos estadísticos para la investigación*. Lima: Editorial Jurídica. 643 p.
11. Câmara DR, Silva SV, Almeida FC, Nunes FJ, Guerra MMP. 2011. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*: 76: 342-350 p.
12. Carro MM, Peñalva DA, Antollini SS, Hozbor FA, Buschiazzi J. 2020. Cholesterol and demosterol incorporation into ram sperm membrane before cryopreservation: Effects on membrane biophysical properties and sperm quality. *BBA-Biomembranes* 1862: 183357.
13. Carretero MI, Pigretti C, Bertuzzi ML, Fumuso FG. 2019. Test hipoosmótico combinado a la tinción de Coomassie blue en espermatozoides de llama. *Spermova*: 8: 129-132 p.
14. Castaño DL, Valencia MP, Murillo E, Mendez JJ, Eras J. 2012. Composición de ácidos grasos de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo) y su relación con la bioactividad del vegetal. *Rev Chil Nutr*: 39: 45-52 p.
15. Castro JP, Vaca CF, Soto EJ, Vargas JR, García G, Bañon J *et al.* 2020. Sacha Inchi oil (*Plukenetia volubilis*) stabilized with antioxidants for addition in fresh cheese. *African J Food Agric Nutr Dev*: 20: 16638-16651 p.
16. Cisneros FH, Paredes D, Arana A, Cisneros-Zevallos L. Chemical composition, oxidative stability and antioxidant capacity of oil extracted from roasted seeds of Sacha-Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *J Agric Food Chem*: 62: 5191-5197 p.

17. da Silva Maia M, Bicudo SD, Azevedo HC, Sicherle CC, de Sousa DB, Rodello L. 2009. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Rumin Research*: 85: 85-90 p.
18. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool* 265: 432-437 p.
19. Ezazi H, Abdi-Benemar H, Taghizadeh A, Khalili B, Seifdavati J, Jafaroghli M *et al.* 2019. The influence of dietary sunflower oil, rich in n-6 polyunsaturated fatty acids, in combination with vitamin C on ram semen parameters, sperm lipids and fertility. *J Sci Food Agric* 99: 3803-3810 p.
20. Ferreira CER, Goularte KL, da Cruz Tavares G, Gheller SMM, Mondadori RG, Vieira AD *et al.* 2019. Impact of distinct freezing curves on the quality of ram sperm after thawing. *Cryo Letters* 40: 193-199 p.
21. Flora SJS. 2009. Structural, Chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev*: 2: 191-206 p.
22. Galarza DA, López-Sebastián A, Woelders H, Blesbois E, Santiago-Moreno J. 2019. Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. *Cryobiology*: 91: 84-89 p.
23. Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* 59: 1241-1255 p.
24. Gordon I. 1997. *Controlled reproduction in sheep & goats*. CAB International: Wallingford. 450 p.

25. Guthrie HD, Welch GR. 2012. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*: 78: 1700-1708 p.
26. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJD. 1992. The hypoosmotic swelling test: An update. *Arch Androl*: 29: 105-116 p.
27. Jiménez-Rabadán P, Soler AJ, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M *et al.* 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Anim Reprod Sci*: 167: 103-108 p.
28. Kaka A, Wahid H, Rosnina Y, Yimer N, Khumran AM, Behan AA, Ebrahimi M. 2015. Alpha-linolenic acid supplementation in tris extender can improve frozen-thawed bull semen quality. *Reprod Dom Anim*: 50: 29-33 p.
29. Kandelousi MA, Arshami J, Naserian AA, Abavisani A. 2013. The effects of addition of omega-3, 6, 9 fatty acids on the quality of bovine chilled and frozen-thawed sperm. *Open Vet J*: 3: 47-52 p.
30. Lee SH, Kim YJ, Kang BH, Park CK. 2019. Effect of nicotinic acid on the plasma membrane function and polyunsaturated fatty acids composition during cryopreservation in boar sperm. *Reprod Dom Anim* 54: 1251-1257 p.
31. Lenzi A, Gandini L, Picardo M, Tramer F, Sandri G, Panfili E. 2000. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): Scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. *Front Biosci*: 5: 1-15 p.
32. Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Tamayo-Canul J, López-Urueña E, de Paz P, Anel L *et al.* 2014. Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. *Anim Reprod Sci*: 151: 137-147 p.

33. Maurer NE, Hatta-Sakoda B, Pascual-Chagman G, Rodriguez-Saona LE. 2012. Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega-3 fatty acids, sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Food Chem*: 134: 1173-1180 p.
34. Miloud L, Karima BR. 2015. Variations in semen characteristics rams of ouled djellal breed have received an important dietary supplement after regular and intensive collection. *Asian Pac J Reprod*: 4: 13-16 p.
35. Ministerio Nacional de Agricultura y Riego. 2013. IV Censo nacional agropecuario 2012. Lima: INEI. 63 p.
36. Mocé E, Blanch E, Tomás C, Graham JK. 2010. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reprod Dom Anim* 45: 57-66 p.
37. Montesinos IS, Catachura A, Sánchez J, Franco JL, Arnhold E, McManus C et al. 2015. Caracterización de ovinos en el litoral sur del Perú. *Anim Gen Resor*: 56: 55-62 p.
38. Mortazavi SH, Eslami M, Farrokhi-Ardabili F. 2020. Comparison of different carrier-compounds and varying concentrations of oleic acid on freezing tolerance of ram spermatozoa in tris-citric acid-egg yolk plasma semen diluent. *Anim Reprod Sci*: 219: 106533.
39. Muiño R, Fernández M, Peña AI. 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod Dom Anim*: 42: 305-311 p.
40. Murphy EM, Eivers B, O'Meara CM, Lonergan P, Fair S. 2018. Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination. *Theriogenology*: 108: 217-222 p.

41. Nasiri AH, Towhidi A, Zeinoaldini S. 2012. Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. *Andrologia*: 44: 550-555 p.
42. Parkinson TJ, Morrell JM. 2019. Artificial insemination. En: Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW. *Veterinary reproduction and obstetrics*. 10ma edición. England: Elsevier. 746-777 p.
43. Paul RK, Balaganur K, Kumar D, Singh R. 2020. Pre-freezing equilibration time for 22h improves post-thaw sperm functions in cryopreserved ram semen by reducing cholesterol efflux. *Cryobiology* 96: 76-84 p.
44. Perumal P, Srivastava N, Pande M, Ghosh SK. 2017. Counting sperm numbers. En: Srivastava N, Pande M. *Protocols in semen biology*. Singapore: Springer. 57-72 p.
45. Poulos A, Brown-Woodman PDC, White IG, Cox RI. 1975. Changes in phospholipids of ram spermatozoa during migration through the epididymis and possible origin of prostaglandin F₂ α in testicular and epididymal fluid. *BBA*: 388: 12-18 p.
46. Purdy PH. 2005. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5°C prior to cryopreservation. *Anim Reprod Sci*: 93: 114-123 p.
47. Ruiz-Pesini E, Alvarez E, Enríquez JA, López-Pérez MJ. 2001. Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. *Int J Androl*: 24: 335-340 p.
48. Safarinejad MR, Hosseini SY, Dadkhah F, Asgari MA. 2010. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile and infertile men. *Clin Nutr*: 29: 100-105 p.

49. Salomon S, Maxwell WMC. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*: 62: 77-111 p.
50. Shahat AM, Thundathil JC, Kastelic JP. 2022. Melatonin or L-arginine in semen extender mitigate reductions in quality of frozen-thawed sperm from heat-stressed rams. *Anim Reprod Sci*: 238: 106934.
51. Shahverdi A, Rastegarnia A, Topraggaleh TR. 2014. Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin Structure of buffalo bull (*Bubalus bubalis*) Spermatozoa. *Cell J* 16: 279-288 p.
52. Sicherle CC, Maia MS, Bicudo SD, Rodello L, Azevedo HC. 2011. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. *Small Rumin Res*: 95: 144-149 p.
53. Srivastava N, Pande M, Din O. 2017. Evaluating sperm cell morphology. En: Srivastava N, Pande M. *Protocols in semen biology*. Singapore: Springer. 90-107 p.
54. Towhidi A, Zeinoaldini S, Ardebili R, Davachi ND, Nasiri AH. 2013. Combined n-3 fatty acids and α -tocopherol supplementation improved the ovine sperm Cryosurvival. *Iran J Biotechnol* 11: 238-243 p.
55. Van Tran L, Ahmad B, Kumar S, Kumar A. 2017. Polyunsaturated fatty acids in male ruminant reproduction – A review. *AJAS*: 30: 622-637 p.
56. Wayne D. 1991. *Bioestadística. Base para el análisis para las ciencias de la salud*. México DF: Limusa. 665 p.
57. Wathes DC, Abayasekara DRE, Aitken RJ. 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod* 77: 190-201 p.
58. White IG. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* 5: 639-658 p.